D 19 (Tierärztliche Fakultät)

Aus dem Tierphysiologischen Institut der Universität München
Vorstand Prof. Dr. J. Paechtner

Über den Eiweißgehalt des Pferdeserums (N x 6,25) und seine Hauptbestandteile unter verschiedenen individuellen Bedingungen

Vergleichende Eiweißbestimmungen im Pferdeserum vor und nach operativen Eingriffen mit Berücksichtigung der Polypeptidfraktion im Reststickstoff

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der

Tierärztlichen Fakultät der Universität in München

vorgelegt von

W. M. Swangard, M. S. A.
Tierarzt aus München

München 1939

Nr. 53/38

Gedruckt mit Genehmigung des Dekans der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Wilhelm Ernst

Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Johannes Paechtner

Tag der mündlichen Prüfung: 28. und 29. Juli 1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus „Biochemische Zeitschrift", Band 301, Heft 5/6

Verlag von Julius Springer in Berlin

Die Mengenverhältnisse der bis heute definierbaren Eiweißkomponenten im Blutserum von normalen Pferden sind bekannt. Zahlreiche Autoren, wie *Abderhalden, Howe, v. Deseö, P. Luy* u. a. (1) (9) (6) (12), haben gezeigt, daß schon unter normalen Verhältnissen die verschiedenen Eiweiße des Serums von Fall zu Fall anteilmäßig variieren. Unter pathologischen Umständen ändert sich an dieser Tatsache im wesentlichen nichts (12), jedoch machen sich je nach Art und Intensität des pathologischen Zustandes Anteilverschiebungen unter den Eiweißgruppen bemerkbar, die sich, wenn auch nicht immer größenmäßig vergleichbar, ziemlich konstant wiederholen und es uns u. U. ermöglichen, gewisse Schlüsse auf das Krankheitsgeschehen zu ziehen, sowie therapeutisch zu verwerten. Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, das anteilmäßige Vorkommen der sogenannten *Howe*schen Eiweißfraktionen des Serumglobulins, das der übrigen Serumeiweiße, des Reststickstoffs und des Polypeptidstickstoffs bei Pferden der hiesigen chirurgischen Tierklinik zu ermitteln und die Werte vor der Operation denen nach dem Eingriff gegenüberzustellen. Gleichzeitig sollte die von *R. O. Bowman* (3) veröffentlichte Schnellbestimmungsmethode mit der Mikro-*Kjeldahl*-Methode nach *Howe* (9), die sich bisher als zuverlässig erwiesen hat, verglichen werden. Nachdem die refraktometrische Methode der Eiweißbestimmung von *v. Deseö* (6) sowie auch von *Luy* (12) abgelehnt werden mußte, besonders wo es sich um Abweichungen von den normalen Verhältnissen im Serum handelt, schien es von Wert zu sein, die nephelokolorimetrische Methode nach *Bowman* hier zu versuchen.

Bestimmt wurden also in jeder Serumprobe Gesamteiweiß, Euglobulin, Pseudoglobulin I, Pseudoglobulin II, Albumin, Reststickstoff und Polypeptidstickstoff. Als Polypeptidstickstoff wird hier nach *P. Cristol* (5) die Differenz im Stickstoffgehalt zwischen dem Filtrat der Trichloressigsäurefällung und dem der Natriumphosphorwolframatfällung bezeichnet. An den letztgenannten Filtraten wurden qualitative Proben auf spezifische Eiweißbausteine durchgeführt.

Methodik.

1. Gewinnung des Serums.

Hueck (10) hat gezeigt, daß nach Defibrinieren ein Verlust an Eiweiß eintritt gegenüber dem „nativen" Serum, da durch das Ausschlagen Eiweißteilchen mitgerissen werden können und der Verlust von CO_2 zum Austritt von Wasser aus den Erythrocyten und dadurch zu einer Verdünnung des Serums führt. Außerdem ist zu erwarten, daß durch einen so heftigen mechanischen Insult die Dispersion des Eiweißes geändert wird und sich, wie *Hueck* fand, dann eben auch die refraktometrischen Werte ändern müssen (10). Andererseits nimmt nach *Loehr* (11) nicht nur mit dem Verbleiben von Serum auf dem Kuchen, sondern auch bei längerem Stehen ohne Kuchen die Eiweißkonzentration zu. Im ersteren Falle besteht ein osmotischer Flüssigkeitsaustausch zwischen Serum und korpuskulären Elementen sowie auch eine geringe Hämolyse. Im letzteren haben wir mit Verlust von Wasser durch Verdunstung sowie CO_2-Absorption und ihren Folgen zu rechnen.

Aus diesen Gründen wurde nur mit Spontanserum gearbeitet und weiterhin auf genaue Einhaltung eines gleichen Zeitpunktes für das jeweilige Abgießen des Serums vom Kuchen und dann wieder für die Entnahme von abgegossenem Serum für die Analysen Wert gelegt. Um den Einfluß von Futteraufnahme, besonders aber der Trinkwasseraufnahme herabzusetzen, wurde die Entnahme jedesmal gegen 11 Uhr vormittags vor der Operation gemacht und dann wieder am Nachmittag, 6 Stunden nach dem Eingriff.

Die Blutentnahme erfolgte — nach gründlicher Desinfektion der Einstichgegend in der Fossa jugularis — mittels steriler Hohlnadel aus der rechten Jugularvene. Das ausströmende Blut wurde in einem sterilen 200-ccm-Meßzylinder aufgefangen. Sobald das Blut den 160-ccm-Strich erreicht hatte, wurde die Zylinderöffnung nach Abflammung mit dem sterilen Wattepfropf wieder verschlossen. Nach einer halben Stunde hatten sich bei Zimmertemperatur die Erythrocyten gesenkt und das Fibrinogen war geronnen. 2 Stunden nach der Gerinnung wurde der Kuchen mittels eines sterilen Glasstabes vom Zylinderrand abgelöst und 6 Stunden nach Entnahme das ausgepreßte Serum unter sterilen Kautelen in einen keimfreien 100-ccm-*Erlenmeyer*-Kolben abgegossen. Nach genau 15stündiger Aufbewahrung im Eisschrank erfolgte die Entnahme von Serum für die Analysen. Zu diesem Zwecke wurde der *Erlenmeyer*-Kolben erst auf Zimmertemperatur gebracht und leicht geschüttelt, wobei das Serum absolut klar blieb. — Alle Behälter, Glasgefäße usw., die in Berührung mit den zu unter-

suchenden Flüssigkeiten kamen, wurden vorher sterilisiert und in sterilem Zustande gehalten. Dies geschah durch Trockenhitze bei 150° für eine Stunde.

2. Eiweißbestimmung.

a) *Kjeldahl*-Methode.

Mit Na_2SO_4-Lösungen nach *Howe* (9) wurden die Globuline gefällt, und zwar durch Zusatz von 30 ccm der entsprechenden Lösung zu 1 ccm unverdünntem Serum. Auf diese Weise gibt 14 %ige Na_2SO_4-Lösung eine 13,5 %ige Endverdünnung und den Ausfall des Euglobulins, 18 %ige Na_2SO_4 + Serum eine Endverdünnung von 17,4 % und den Ausfall von Euglobulin + Pseudoglobulin I, 22,2 %ige Na_2SO_4 eine Endlösung von 21,5 % und Ausfall aller Globuline.

In einem Vorversuch wurde die von *Howe* angegebene Zonenbildung beobachtet, d. h. bei Erhöhung der Konzentration von 13,5 % Na_2SO_4 auf 14,4 % sowie bei einer entsprechenden Erhöhung von 17,5 auf 18,3 % bzw. von 21 auf 25 % Na_2SO_4 zeigte sich keine Abnahme des N-Gehalts in den entsprechenden Filtraten. Die Na_2SO_4-Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und steril im Brutschrank bei 37,5° C aufbewahrt, um das Ausfallen von Natriumsulfat bei Zimmertemperatur zu verhindern. Alle Ausfällungen und Filtrationen (Faltenfilter Nr. 605, *Schleicher & Schüll*, steril) sowie das Aufbewahren der Filtrate geschahen gleichfalls im Brutschrank bei 37° unter sterilen Maßnahmen. Wenn die Filtrate 5 Stunden klar geblieben waren, wurden Proben zur analytischen Auswertung entnommen.

In einigen Vorversuchen mit nichtsterilisierter Lösung und unsterilem, aber sauberem Glas beeinträchtigte Bakterientätigkeit schon nach vierstündigem Stehen (was zur vollständigen Fällung der entsprechenden Globuline nötig ist) die Resultate merklich. Aus der 22,5 %igen Na_2SO_4-Lösung wurden vor der Sterilisation auch noch nach längerem Stehen Kulturen von Aerobacter aerogenes sowie eines Proteustyps auf Nährbouillonagar erhalten.

Der Stickstoffgehalt der einzelnen Proben wurde in je 1 ccm der Filtrate bzw. des entsprechend verdünnten Serums mit Mikro-*Kjeldahl* in Triplikatanalysen bestimmt. Veraschung unter Zusatz von $CuSO_4$. Die Aschenlösungen wurden im Destillationsapparat von *Parnas-Wagner* in n/100 Schwefelsäure destilliert und dann mit n/100 Natriumhydroxyd austitriert. Mit jeder Reihe ging ein Blindversuch; Umrechnung auf Eiweiß durch Multiplikation mit 6,25.

b) Nephelokolorimetrische Eiweißbestimmung.

Die Schnellmethode *Bowmans* mißt die durch Sulfosalicylsäure in den Na_2SO_4-Filtraten bzw. im entsprechend verdünnten Serum entstehenden Trübungen mit dem Mikro-(Piccolo-)Kolorimeter von *Hellige*. An Stelle desselben wurde von uns die Mikroeinrichtung des *Dubosq*-Kolorimeters Nr. 1862 der gleichen Firma verwendet, im übrigen aber nach Vorschrift verfahren. Die aus normalem Pferdeserum hergestellte Vergleichs-Eiweißstandardlösung enthielt 30 mg% Eiweiß. Genau 0,20 ccm Serum wurden mit 39,8 ccm physiologischer NaCl-Lösung gemischt, 2 ccm dieser Verdünnung sowie 2 ccm der Proteinstandardlösung in zwei Reagensgläsern

mit je dem gleichen Volumen 5%iger Sulfosalicylsäure versetzt und sofort im Kolorimeter verglichen. $h_1/h_2 \cdot 6{,}00 = g\%$ Eiweiß. Für die Proteinbestimmung in den *Howe*-Filtraten wird 1 ccm Filtrat nur mit 3 ccm Aqua dest. verdünnt und mit 4 ccm Sulfosalicylsäure gefällt. Umrechnungsfaktor dann 3,72. Wenn die zu untersuchenden Lösungen weniger als halb oder mehr als doppelt so dicht waren als die Vergleichslösung, mußte die Bestimmung mit geeigneteren Konzentrationsverhältnissen wiederholt und mit dem entsprechenden Faktor berechnet werden. Die Zeitspanne zwischen der Zugabe von Sulfosalicylsäure, die gleichzeitig bei Standard- und unbekannter Lösung erfolgen muß, und Kolorimeterablesung ist möglichst kurz zu halten. Sie wurde mit der Stoppuhr kontrolliert. Auf gleichmäßige Beleuchtung beider Kolorimeterhälften mit Tageslicht — eine eingebaute künstliche Lichtquelle stand nicht zur Verfügung — muß besonders geachtet werden, ebenso auf Reinheit der Glasgefäße und gute Durchmischung der Lösungen.

3. *Rest-N-Bestimmung.*

Der Reststickstoff wurde durch Fällung mit phosphorwolframsaurem Natrium sowie durch Trichloressigsäurefällung im Filtrat erhalten. Bei der Phosphorwolframsäurefällung wurde ein Volumen (5 ccm) Serum mit 2 Volumen Wasser versetzt und aus einer Bürette 1 Volumen 10%ige wässerige Lösung von Natriumphosphorwolframat zugefügt. Dann wurde aus einer weiteren Bürette langsam 1 Volumen $^2/_3$ n Schwefelsäure in die Serumwolframatmischung einlaufen gelassen. Wenn der p_H des Serums unter 8 lag, ergab die Hinzufügung von Phosphorwolframat einen geringen Niederschlag (der bei Na-Wolframat nicht erhalten wird). Erst die Zugabe der Säure ergibt jedoch den schweren Eiweißniederschlag. Um die vollständige Wirkung der Phosphorwolframatlösung zu erreichen, muß der p_H der Lösung nach beendigter Fällung $\leqq 1{,}8$ sein.

Bei der Trichloressigsäurefällung war beabsichtigt, wie in der Phosphorwolframatfällung auf 1:5 zu verdünnen. 1 Volumen Serum wurde daher mit genau 1,5 Volumen Wasser verdünnt und dann aus einer Bürette langsam mit 2,5 Volumen 50%iger Trichloressigsäure versetzt. Dadurch erhielt die Endlösung zugleich die von *Cristol* empfohlene Konzentration von 25% Trichloressigsäure.

Der Stickstoff wurde dann für jedes Serum in beiden Filtraten durch Mikro-*Kjeldahl* in derselben Weise bestimmt wie unter „Eiweißbestimmung", nur daß 5 ccm Trichloressigsäurefiltrat pro *Kjeldahl*-Kolben verwandt wurden und 3 ccm Natriumphosphorwolframat. Im voluminösen Phosphorwolframatniederschlag wurde mehr Flüssigkeit zurückgehalten, so daß bei einer Anfangsmenge von 5 ccm Serum das Filtrat gerade für drei *Kjeldahl*-Proben von 3 ccm ausreichte. Die unter „Eiweißbestimmung" erwähnten Filtrierpapiere wurden auch hier benutzt.

4. *Polypeptidstickstoff.*

Die Differenz der N-Gehalte zwischen den beiden Ausfällungen ist in dieser Arbeit (nach *Cristol*) als Polypeptidstickstoff bezeichnet. Es war von Interesse, diese Filtrate mit einigen Proteinfarbenreaktionen zu proben. In Tabelle IV ist eine Zusammenstellung gegeben. Benutzt wurden die *Millon*sche Reaktion für Peptone und Proteosen (8), die Biuretprobe in der *Posner*schen Ringmodifikation (8) und die Triketohydrinden- (Ninhydrin-) Probe (8). In der letzteren ergaben sich anfangs Schwierigkeiten infolge

der hohen Azidität des zu untersuchenden Filtrats. Diese konnten umgangen werden dadurch, daß das Filtrat mit n/10 NaOH leicht basisch gemacht (Lackmuspapier), dann 5 ccm davon nach Zusatz von 2 ccm einer 0,1 %igen Ninhydrinlösung in einem Reagensglas zum Sieden gebracht wurde. In die heiße Lösung wurde dann aus einer Bürette n/10 Schwefelsäure eingetropft. Sobald der Umschlag von basisch zu sauer eintrat, entstand ein deutlicher blauer Schleier in der oberen Hälfte des Röhrchens, der je nach der Qualität des Filtrats von verschiedener Intensität war.

5. Versuchsmaterial.

Nr. 15. 8 Jahre alter Fuchs, Wallach, Kaltblut, normal.

Nr. 17. 11 Jahre alter Wallach, Kaltblut, nie operiert, zeigte seit einem halben Jahr Fieberzustände in zweimonatigen Intervallen. Zur Zeit der Blutentnahme Puls 70, Atem 36 in der Minute. Temperatur im Mastdarm 41° C. Anämieverdacht, jedoch bereits zwei Blutproben als negativ von der staatlichen Untersuchungsstelle befunden worden. 2 Tage später nach exitus letalis wies Obduktion und histologische Organuntersuchung auf ansteckende Blutarmut hin.

Nr. 18. 8 Jahre alter Wallach, Kaltblut, Hufkrebs, Operation bevorstehend, sonst normal.

Nr. 18, P. O. 6 Stunden nach erfolgter Operation. Narkose: Chloralhydratinfusion 28 g in 4 %iger Lösung mit nachfolgender Chloroforminhalationsnarkose.

Nr. 19. Schweißfuchs, Kaltblut, Wallach, 4 Jahre alt. Operiert wegen Hufkrebs am 30. 6., am Abend des Operationstages leichtes Fieber, das später anstieg. Narkose: Chloralhydratinfusion 30 g in 4 %iger Lösung intravenös, mit nachfolgender Chloroforminhalationsnarkose. Blut entnommen am 2. 7., als Fieberkurve am höchsten (39,5° C).

Nr. 20. Fuchsstute, 4 Jahre alt, Zahnextraktion unter Totalnarkose bevorstehend, sonst normal, Kaltblut.

Nr. 20, P. O. 6 Stunden nach erfolgtem Eingriff. Narkose: Infusion von 8 g Narcogen in 20 %iger Lösung intravenös mit nachfolgender Chloroforminhalationsnarkose. Nach erfolgter Operation Injektion von 10 ccm Cardiazol als Weckmittel.

Nr. 21. Hufkrebsoperation bevorstehend. $2^1/_2$ Jahre alter, schwarzer Wallach, Kaltblut, sonst normal.

Nr. 21, P. O. 6 Stunden nach erfolgtem Eingriff. Narkose wie unter Nr. 20. Temperatur zur Zeit der Entnahme 38° C, Blutverlust stark.

Nr. 22. 3 Jahre alte Stute, Kaltblut leichteren Typs, Kopper, sonst normal. Radikaloperation gegen Koppen bevorstehend. Die Blutentnahme wurde durch Aufgeregtheit des Tieres für analytische Zwecke verdorben.

Nr. 22, P. O. 6 Stunden nach erfolgter Operation. Myektomie der Mm. sternothyreoidei, sternohyoidei und sternomandibulares beiderseitig. Blutverlust stark. Narkose: Intravenöse Infusion von 32 g Chloralhydrat mit nachfolgender Chloroforminhalation.

Nr. 23. 9 Jahre alte Stute, Kaltblut, Warzenmauke hinten links, sonst normal.

Nr. 23, P. O. 6 Stunden nach erfolgtem Eingriff. Narkose: Lokalbetäubung durch Infiltration des unteren N. plantaris mit 20 ccm 4 %igem

Anaecain, Abtragung der Wucherungen mit Schleifenmesser und nachfolgender Wundverband, Blutverlust gering.

Nr. 24. $1^1/_4$ Jahre alter Hengst, Warmblut, normal.

Nr. 24, P. O. 6 Stunden nach erfolgter Kastration. Links Kryptorchismus, rechts normale Kastration. Narkose: Intravenöse Infusion von 20 g Chloralhydrat mit nachfolgender Chloroforminhalation. Nach der Operation Tetanusantitoxininjektion.

Nr. 25. $1^1/_2$ Jahre alter Hengst, Warmblut, normal.

Nr. 25, P. O. 6 Stunden nach erfolgter Kastration. Narkose wie Nr. 24, nur 22 g Chloralhydrat. Nach Operation ebenso Tetanusantitoxingabe, wie Nr. 24. Blutverlust bedingt durch erschwerende Umstände während der Operation.

Resultate.

1. Gesamteiweiß und Eiweißfraktionen.

Zunächst sollen die Ergebnisse der kjeldahlometrischen Eiweißbestimmungen (Tabelle I) betrachtet werden. Der Gesamteiweißgehalt aller untersuchten Proben bewegt sich zwischen 5,08 und 7,96 g%; sieht man von den beiden Fieberfällen Nr. 17 (Anämieverdacht, Temperatur 41,0°) und Nr. 19 (postoperatives Fieber 39,5°) ab, so liegen alle Werte zwischen 6,15 und 7,96 g%. Diese Zahlen stimmen sehr gut mit denen *P. Luys* überein, der bei 31 klinisch gesunden Pferden 5,53 bis 7,59 g%, bei 24 an infektiöser Anämie kranken 5,16 bis 8,02 g% Eiweiß ermittelte. Es ist zu bemerken, daß der Minimalwert 5,53 bei den gesunden Tieren *Luys* nur einmal vorkam, der nächsthöhere war bereits 6,01 g%. *Luy* fand ferner für Kaltblüter durchschnittlich höhere Eiweißgehalte als für Warmblüter. An dem vorliegenden Material liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt, allerdings waren nur die

Tabelle I. Gesamteiweiß und Eiweißfraktion (g% N · 6,25). Mikro-*Kjeldahl*-Methode.

Nr.	Euglobulin	Pseudoglobulin I	Pseudoglobulin II	Gesamtglobulin	Albumin	Gesamt-Eiweiß	Albumin/Globulin
15	1,08	1,58	1,62	4,28	3,61	7,89	0,84
17	0,77	0,79	1,56	3,13	2,13	5,25	0,68
19	0,29	2,10	0,91	3,30	1,78	5,08	0,54
18	0,80	2,05	1,22	4,06	2,48	6,54	0,61
18PO	0,64	2,15	1,35	4,14	2,09	6,23	0,50
20	1,96	2,05	0,85	4,86	2,66	7,52	0,55
20PO	0,88	2,21	0,90	3,99	2,34	6,32	0,59
21	0,61	2,01	0,61	3,22	3,46	6,68	1,07
21PO	0,37	1,66	0,66	2,68	3,48	6,16	1,30
22PO	0,32	2,40	0,31	3,03	3,27	6,29	1,18
23	1,12	1,27	0,98	3,36	2,78	6,15	0,83
23PO	0,98	1,95	0,98	3,90	3,15	7,06	0,77
24	0,62	2,21	2,34	5,16	2,80	7,96	0,54
24PO	0,11	2,63	2,27	5,01	2,38	7,39	0,48
25	1,28	1,44	2,22	4,93	2,68	7,61	0,54
25PO	1,21	1,32	1,66	4,19	2,55	6,74	0,61

Tiere Nr. 24 und 25 Warmblut, alle übrigen acht gehörten Kaltblutschlägen an.

Das Albumin/Globulinverhältnis bewegt sich (Abb. 1) zwischen den Grenzen 0,48 und 1,30; in der Mehrzahl der Fälle (82%) liegt es, gleichgültig, ob man nur die voroperativen oder alle Bestimmungen betrachtet, unter 1. Damit bestätigen sich die Angaben *v. Deseös* sowie *Luys* (l. c. S. 83). Der letztere fand den Quotienten refraktometrisch in etwa 85% seiner Bestimmungen an Normaltieren und annämiekranken Pferden (von 0,46 bis 1,24 reichend) < 1, wenn der Auswertung die von *v. Deseö* für Pferdeserum ermittelten spezifischen Brechungswerte für Albumin und Globulin zugrunde gelegt wurden,

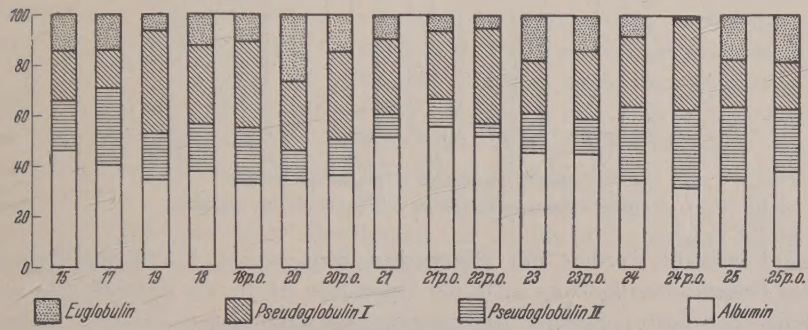

Abb. 1. Eiweißfraktionen in Prozenten vom Gesamteiweiß.

während die Anwendung der von *Robertson* an Rinderserum bestimmten Refraktionen beim Pferdeserum unwahrscheinlich hohe Quotienten ergab.

An unserem Material ist auch deutlich ein Einfluß der seit der letzten Nahrungsaufnahme vergangenen Zeit auf die Eiweißverteilung feststellbar. Er wirkt sich auf das Albumin/Globulinverhältnis im Sinne einer Erniedrigung aus. Während alle übrigen Tiere die letzte Mahlzeit am Vorabend des Operationstages erhalten hatten, war bei Nr. 18 und 20 diese Fütterung, bei Nr. 24 und 25 auch noch die vorletzte ausgefallen. Der voroperative Gesamtglobulingehalt liegt bei den genannten Tieren deutlich höher als bei den übrigen, und zwar entsprechend der längeren Dauer des Fastens bei Nr. 24 und 25 nochmals höher als bei Nr. 18 und 20. Infolgedessen liegen die zugehörigen Albumin/Globulinquotienten durchwegs zwischen 0,5 und 0,6, also ziemlich niedrig. Die Zunahme der Globuline durch Fasten betrifft im wesentlichen die Pseudoglobulinfraktion (I + II), während das Euglobulin hiervon offenbar nicht beeinflußt wird.

Darüber hinaus zeigt die Verteilung der Globulinunterfraktionen verhältnismäßig wenig Regelmäßigkeit. Immerhin läßt sich erkennen,

daß das Euglobulin selten mehr als $^1/_3$ bis $^1/_4$ der Gesamtglobuline ausmacht, und daß oft mehr als die Hälfte der Globulinfraktion aus Pseudoglobulin I besteht (Abb. 1).

2. Vergleich der vor- und nachoperativen Eiweißwerte.

6 Stunden nach der Operation war der Gesamteiweißgehalt mit Ausnahme des Falles Nr. 23 stets deutlich niedriger als vor der Operation (Abb. 2). Bei Nr. 23 war im Unterschied zu den übrigen Fällen nur

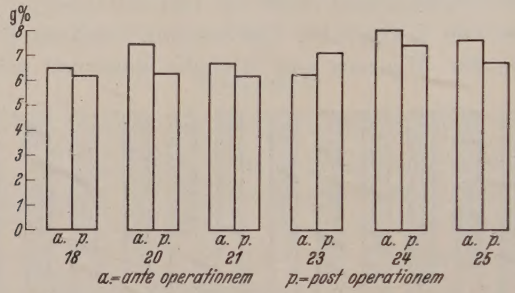

Abb. 2. Gesamteiweißgehalt vor und nach der Operation.

lokal betäubt worden, der Blutverlust war gering. Die Erniedrigung des Gesamteiweißgehalts nach der Operation dürfte im wesentlichen als Folge der postoperativen Blutverdünnung aufzufassen sein (2). Außer

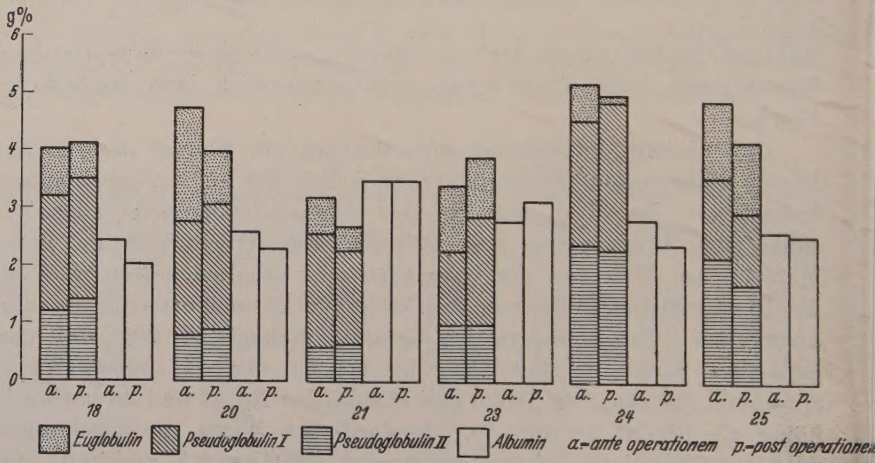

Abb. 3. Gesamtglobulin und Albumin vor und nach der Operation.

dieser Abnahme des Gesamteiweißgehalts sind nach dem Eingriff aber auch die einzelnen Eiweißgruppen absolut und relativ zueinander in spezifischer Weise verschoben (Abb. 1 und 3). Typisch kehrt in allen Fällen die Abnahme des Euglobulingehalts wieder, mit Ausnahme von Nr. 25 auch relativ zu den übrigen Globulinfraktionen und dem Gesamt-

eiweiß. Umgekehrt ist der relative Anteil der schwerer aussalzbaren Fraktionen (Albumin + Pseudoglobulin I und II) nach der Operation stets erhöht (Abb. 1), obwohl ihre absolute Konzentration gleichfalls abgenommen hat. Wenn auch das Ausmaß der erwähnten Verschiebungen von Fall zu Fall ohne erkennbare Beziehung zu dem jeweils vorgenommenen Eingriff wechselt, so ist doch ihre Gleichsinnigkeit bemerkenswert. Ob sich hierin etwa ein Einfluß der Narkose bzw. des Narkoticums äußert, läßt sich an dem vorliegenden Material nicht entscheiden. Vielleicht steht die relative Vermehrung der stabileren Eiweißfraktionen mit der postoperativen Regeneration der Serumproteine in Zusammenhang, die zuerst bei den niedrigermolekularen Fraktionen einsetzt und sich möglicherweise nicht auf die Albuminfraktion (4) beschränkt. Denn dann wäre eine regelmäßige Verlagerung des Albumin/Globulinverhältnisses zu erwarten, die indessen tatsächlich nicht besteht. Dreimal ist Albumin/Globulin nach der Operation größer, ebensooft kleiner als vor der Operation. Stellt man hingegen die Euglobulinfraktion der Summe der übrigen Eiweißkörper des Serums gegenüber (Euglobulin:[Albumin + Pseudoglobulin I + Pseudoglobulin II]), so ergibt sich in fünf von den sechs Fällen eine postoperative Abnahme dieses Quotienten um 20 bis 50 %, einmal bleibt er innerhalb der Fehlergrenze unverändert.

3. Die nephelokolorimetrische Methode

Die nephelokolorimetrische Methode (Tabelle II) lieferte von den kjeldahlometrischen Bestimmungen stark abweichende Resultate. Am besten stimmen noch die Werte für das Gesamteiweiß, die im Mittel mit 6,67 gegenüber 6,48 g% nur um 3 % differieren, doch kommen Einzelabweichun-

Tabelle II. Gesamteiweiß und Eiweißfraktion (g% N · 6,25) im Serum. Nephelo-Kolorimetriemethode.

Nr.	Euglobulin	Pseudo-globulin I	Pseudo-globulin II	Gesamt-globulin	Albumin	Gesamt-eiweiß
15	1,23	2,12	0,14	3,49	4,05	7,54
17	0,97	1,44	0,53	2,94	1,48	4,43
19	1,56	1,87	0,53	3,96	2,77	6,73
18	0,78	2,01	0,05	2,84	3,82	6,66
18PO	0,37	1,77	0,42	2,56	3,57	6,14
20	1,32	1,72	0,01	3,05	3,05	6,10
20PO	1,10	1,30	0,03	2,42	3,64	6,06
21	0,95	1,45	0,26	2,67	3,55	6,21
21PO	0,49	1,37	0,50	2,36	3,47	5,83
22PO	1,47	1,51	0,56	3,54	2,62	6,16
23	0,32	1,78	0,83	2,93	3,44	6,36
23PO	1,33	1,62	0,28	3,23	3,49	6,72
24	0,99	3,43	0,82	5,23	2,54	7,78
24PO	1,22	2,95	0,72	4,89	2,38	7,27
25	1,83	1,76	0,55	4,14	3,17	7,31
25PO	1,92	1,41	0,19	3,52	3,36	6,88

gen bis zu 1,65 g% vor. Hingegen werden die Albumingehalte mit der Nephelometermethode fast ausnahmslos zu hoch gefunden, so daß sie im Mittel rund 15% über den *Kjeldahl*-Werten liegen. Dies dürfte durch die Instabilität der Sulfosalicylsäurefällung des Albumins bedingt sein, die zu einer fortschreitenden Vergröberung der Suspension und damit zu einer so schnellen Zunahme der Trübung führt, daß auch bei schnellster Ablesung und Einhaltung gleicher Ablesezeiten keine brauchbaren Resultate erzielt werden konnten. Die Fehler der Albuminbestimmung wirken sich auf die Werte des Pseudoglobulins II, das sich als Unterschied von Pseudoglobulin I und Albumin ergibt, in stärkstem Maße aus. Die Mittelwerte der beiden Verfahren differierten hier um 70% des *Kjeldahl*-Wertes. Die Zahlen für Euglobulin und Pseudoglobulin I zeigen zwar prozentual weniger starke Abweichungen, sind aber auch nicht als quantitative Angaben verwertbar. Die nephelokolorimetrische Methode hat sich demnach für diesen Zweck als völlig unbrauchbar erwiesen. Die Ursache dürfte in den verschiedenen Fällungsbedingungen bei Proteinvergleichslösung und Untersuchungslösung liegen.

4. Rest-N und Polypeptid-N.

Die Reststickstoffwerte (Tabelle III) bewegen sich innerhalb der üblichen Grenzen. Die postoperativen Zahlen sind für beide Filtrate ungefähr gleichhäufig höher oder niedriger als die voroperativen (Abb. 4).

Tabelle III. Reststickstoff und Polypeptidstickstoff des Serums in mg% N.

Nr.	Rest-N		Polypeptid-N	Nr.	Rest-N		Polypeptid-N
	CCl_3COOH-filtrat	Phosphorwolframsäurefiltrat			CCl_3COOH-filtrat	Phosphorwolframsäurefiltrat	
15	33,74	31,67	2,07	21PO	33,33	28,93	4,40
17	40,73	34,07	6,65	22PO	35,60	31,24	4,36
19	26,14	25,30	0,84	23	26,29	22,64	3,65
18	25,41	23,31	0,10	23PO	30,82	21,76	9,06
18PO	28,68	28,43	0,25	24	29,43	28,09	1,34
20	38,99	23,06	15,93	24PO	27,04	24,74	2,30
20PO	27,68	27,67	0,01	25	29,18	27,90	1,30
21	32,77	32,07	0,70	25PO	34,38	32,07	2,31

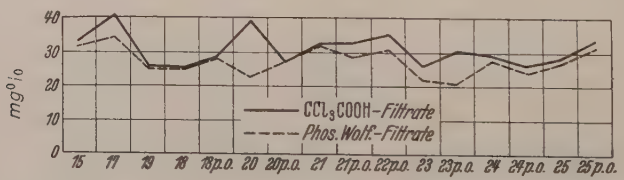

Abb. 4. Rest-N im Trichloressigsäure- und Phosphorwolframsäurefiltrat.

Ein Zusammenhang mit der Art der Narkose ist nicht ersichtlich. Der relativ hohe Rest-N des Trichloressigsäurefiltrats bei Pferd Nr. 17 gab Veranlassung zur Durchführung der Farbenreaktionen an den Filtraten

Tabelle IV. Qualitative Farbenreaktion an Reststickstoff-Filtraten.

Nr.	*Millon*-Reaktion		Biuretreaktion		Ninhydrinreaktion	
	CCl_3COOH-filtrat	Phosphor-wolfram-säurefiltrat	CCl_3COOH-filtrat	Phosphor-Wolfram-säurefiltrat	CCl_3COOH-filtrat	Phosphor-wolfram-säurefiltrat
16	0	0	0 +	0	+	0 +
17	0	0	0 +	0	+++	0 +
18	0	0	0 +	0	++	+
19	0	0	0 +	0	0 +	0 +
20	0	0	schwach +	0	+++	0 +
20 PO	0	0	0 +	0	0 +	0 +
21	0	0	0 +	0	+	0 +
21 PO	0	0	schwach +	0	++	+
22 PO	0	0	schwach +	0	++	+
23	0	0	0 +	0	+	0 +
23 PO	0	0	schwach +	0	++	+
24	0	0	0 +	0	0 +	0
24 PO	0	0	schwach +	0	++	+
25	0	0	0 +	0	0 +	0
25 PO		0	0 +	0	+	+

+++ tiefblauer Schleier; ++ blauer Schleier; + leicht blauer Schleier; 0+ Schleier mit kaum erkennbarem Blau; 0 keine Farbe.

(Tabelle IV). Während die *Millon*sche Probe in sämtlichen Filtraten negativ war, fiel die weitaus empfindlichere Ninhydrinreaktion in allen Trichloressigsäure- und den meisten Phosphorwolframsäurefiltraten positiv aus. Der Intensitätsunterschied der Blaufärbung entsprach bemerkenswert gut dem Unterschied der N-Gehalte beider Filtrate, also dem sogenannten Polypeptid-N*. So schwer es ist, Genaues über die chemische Herkunft und Struktur von Substanzen auszusagen, die durch Ausfällungsmethoden in hoher Verdünnung fraktioniert werden und dabei immer noch dem Einfluß der Polypeptidasen des Blutes unterliegen (7), so deutet doch die Parallelität zwischen dem Ausfall der Ninhydrinreaktion und dem „Polypeptidindex" (*Cristol*), sowie die Regelmäßigkeit, mit der die Differenz der N-Gehalte nach der Operation, unabhängig von dem Steigen oder Fallen der Reststickstoffwerte sich ändert (Abb. 4), darauf hin, daß im wesentlichen immer die gleichen Körper den Polypeptid-N bedingen. Hierfür spricht auch die Positivität der Biuretreaktion in den Trichloressigsäurefiltraten bzw. ihre Negativität in den Phosphorwolframsäurefiltraten. Mit Ausnahme von Nr. 20 war der Polypeptidstickstoff nach der Operation stets höher als vorher, was wohl dem erhöhten Gewebszerfall im Operationsgebiet zuzu-

* Eine quantitative Auswertung der Ninhydrinreaktion, etwa nach den Angaben *Riffart*s (13), war leider im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich.

schreiben ist. Bei Fall Nr. 20 bestand vor der Operation eine Diastase mit Ansammlung jauchiger Futtermassen und starker Entzündung der betroffenen Gingivateile. Interessant ist das fast völlige Verschwinden der Polypeptidfraktion nach Entfernung des Entzündungsherdes, der also wohl die Ursache des ungewöhnlich hohen voroperativen Polypeptidwertes gewesen ist.

Erwähnenswert ist noch, daß die drei Hufkrebsfälle Nr. 18, 19 und 21 übereinstimmend die niedrigsten Polypeptidgehalte aufwiesen.

Zusammenfassung.

1. Im aseptisch gewonnenen Serum chirurgisch erkrankter Pferde wurde kurz vor und 6 Stunden nach der Operation das Gesamteiweiß und seine Fraktionen (Albumin, Gesamtglobulin, Pseudoglobulin I und II, Euglobulin), der Rest-N des Trichloressigsäure- und des Phosphorwolframsäurefiltrats, sowie der Polypeptidstickstoff bestimmt.

2. Je nach der Schwere des Eingriffs war der Gesamteiweißgehalt der postoperativen Seren vermindert. Die Abnahme betraf stets die Euglobulinfraktion, die übrigen Eiweißuntergruppen zeigten kein einheitliches Verhalten, so daß der Albumin Globulinquotient bald erniedrigt, bald erhöht sein konnte. Albumin und Pseudoglobuline zusammengenommen waren nach der Operation relativ vermehrt.

3. In den postoperativen Seren fanden sich von einem Sonderfall abgesehen, stets erhöhte Werte für den Polypeptid-N, unabhängig von der Höhe des Reststickstoffs, der seinerseits in keiner Beziehung zu den Eiweißfraktionen stand. Die Ninhydrinreaktion der Rest-N-Filtrate konnte qualitativ mit dem Polypeptidindex in Zusammenhang gebracht werden.

4. Verhältnismäßig kurzes Fasten der Tiere ließ den Gesamtglobulingehalt im Serum merklich ansteigen.

5. Die nephelokolorimetrische Schnellmethode zur Bestimmung der *Howe*schen Eiweißfraktionen erwies sich als ungeeignet für quantitative Bestimmungen.

6. Für die Trennung der Eiweißgruppen nach *Howe* ist steriles Arbeiten unerläßlich, denn sogar aus Lösungen, die Natriumsulfat bis zu Konzentrationen von 22,2 % enthielten, konnten anderenfalls Kulturen von Aerobacter aerogenes sowie eines zur Proteusgruppe gehörigen Mikroorganismus gewonnen werden.

Am Ende dieser Untersuchungen, die in den Monaten April bis Juli 1938 im Tierphysiologischen Institut der Universität München durchgeführt wurden, möchte ich meinem verehrten Lehrer und Freund, Herrn Professor Dr. *Paechtner*, meinen besonderen Dank aussprechen für die Beauftragung mit der Arbeit, sein interessevolles Entgegenkommen und seine Unterstützung in allen Phasen des Problems. Ebenso möchte ich an dieser Stelle

Herrn Professor Dr. *M. Westhues*, Vorstand der Chirurgischen Tierklinik der Universität danken für die bereitwillige Unterstützung in der Beschaffung des Materials. Herrn Dr. *Gürsching* sage ich für mannigfache Unterstützung gleichfalls herzlichen Dank.

Literatur.

1) *Abderhalden, E.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 3544, 1907. — 2) *Blitstein, I.*, Rev. belge Sci. méd. **8**, 73, 1937; **9**, 293, 1937. — 3) *Bowman, R. O.*, J. lab. a. clin. Med. **21**, 1936. — 4) *Burger, K.*, Zentralbl. f. Gyn. **50**, 294, 1926. — 5) *Cristol, P.*, Bull. Soc. Chim. Biol. **11**, 92, 1929; C. r. Soc. Biol. **100**, 531, 1929. — 6) *Deseö, D. v.*, diese Zeitschr. **200**, 126, 1928. — 7) *Grassmann, W.* u. *W. Heyde*, Zeitschr. f. phys. Chem. **188**, 69, 1930. — 8) *Hawk* u. *Bergeim*, Practical Physiological Chemistry, Chicago 1935, Blakiston Press. — 9) *Howe, P.*, J. Biol. Chem. **49**, 93 u. 109, 1921. — 10) *Hueck, H. Ph.*, diese Zeitschr. **159**, 160, 1925. — 11) *Loehr, H.*, Arch. f. klin. Chir. **1922**, 121; **1925**, 136. — 12) *Luy, P.*, Chem. u. physikochem. Unters. d. Blutes u. Serums normaler u. an infektiöser Anämie erkrankter Pferde. Hab.-Schrift. Hannover, M. u. H. Schaper, 1930. — 13) *Riffart, H.*, diese Zeitschr. **131**, 98, 1922.

Lebenslauf

Am 3. September 1903 wurde ich, Wolf Michael Swangard, zu München als Sohn des Dr. phil. Friedrich Michael Schwangart geboren. In Deutschland erhielt ich die vierjährige Volksschulausbildung in Neustadt (Rheinpfalz) und spätere Ausbildung an den Gymnasien zu Dresden (Hl. Kreuz), Burghausen a. d. Salzach und Schweinfurt, von wo ich mit Obersekundareife abging.

Nach meiner Übersiedlung und Einbürgerung in Kanada besaß ich bereits im Jahre 1927 meine eigene Farm und das nötige Geld, um mein Studium fortzusetzen. Ich beendete die Mittelschule dort auf dem Agriculture College von Saskatoon. Nach vollzogener Reifeprüfung studierte ich an der Universität von Saskatchewan von 1929 bis 1933. Ebenda erwarb ich das Landwirtschaftliche Staatsdiplom und wurde darauf in der Tätigkeit eines Assistenten an dem Laboratorium für Biochemie und Bakteriologie des Staatsministeriums in Nanking (China), angestellt. Ein Jahr später, 1934, kehrte ich nach Kanada an die Universität von Britisch-Kolumbien zurück, wo ich nach zweijährigem Studium an der Fakultät für präventive Medizin und Bakteriologie zum Master of Science promovierte. Im Sommer 1936 erhielt ich die Stelle des physiologischen Instruktors an der dortigen Forstabteilung. Im Herbst 1936, vor meiner Abreise zum Studienaufenthalt nach Deutschland, verheiratete ich mich mit Helen Mary Mathews, der Tochter des Prorektors der Universität von Britisch-Kolumbien.

Seit Herbst 1936 studiere ich Tiermedizin an der Universität München, um nach meiner Rückkehr das Endsemester in Tiermedizin im Herbst 1938 in London zu studieren und im Frühjahr 1939 meine Approbationsprüfung zu machen.

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig
Printed in Germany